

Undersökning av *Brenneria salicis* förekomst i pilar i Skåne

– Är "Watermark Disease" nära?

Screening for the occurrence of *Brenneria salicis* in willows
in Skåne, Sweden

– Is the Watermark Disease close?

Joakim Stefansson



Undersökning av *Brenneria salicis* förekomst i pilar i Skåne

Screening for the occurrence of *Brenneria salicis* in willows in Skåne, Sweden

Joakim Stefansson

Handledare: Sammar Khalil, SLU,
Institutionen för Biosystem och Teknologi
Btr handledare: Johanna Witzell, SLU,
Institutionen för Sydsvensk Skogsvetenskap
Examinator: Malin Hultberg, SLU,
Institutionen för Biosystem och Teknologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Kandidatarbete i Biologi

Kurskod: EX0493

Program/utbildning: Trädgårdsingenjör: Odling – Kandidatprogram

Detta arbete har tillkommit genom Partnerskap Alnarps projekt: *Förekomst av watermark sjukdom hos pilar i Skåne*.

Utgivningsort: Alnarp

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Joakim Stefansson

Serietitel, nr: Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Brenneria salicis*, *Salix alba*, *Salix*, Pil, Vitpil, Grönpil, Watermark Disease, Watermerkziekte, Watermark, PCR, Bakterios, Vissnesjuka, Endofyt, Endofytism, Symbios, Mutualism, Träd, Skåne,

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap
Institutionen för Biosystem och Teknologi

Sammanfattning

Bakterien *Brenneria salicis* lever i xylemet hos bland annat arter av *Salix*. Under vissa omständigheter ger den upphov till en vissnesjuka, internationellt känd som *Watermark Disease*. Utbrott av denna har aldrig rapporterats från Sverige, men då forskning visat att bakterien ofta uppträder som endofyt och inte patogen uppstår frågan om själva bakterien ändå inte finns i Sverige utan att orsaka vissnesjuka. Samma forskning visar nämligen att yttre faktorer kan förmå bakterien att övergå från en endofytisk till en patogen livsstil. Under antagandet att klimat och markanvändning är sådana faktorer och vetenskapen att de är i förändring blir det angeläget att undersöka *B. salicis* utbredning. Detta arbete är första steget mot kunskap om *B. salicis* förekomst i Sverige.

Prov av *Salix alba* 'Saba' har samlats in från tre platser i Skåne. De har testats för förekomst av *B. salicis* med PCR. Förekomst kunde inte detekteras i något fall. Jordprov från platserna har också tagits för näringsanalys.

Studien hade begränsad omfattning, men har lett till följande slutsatser:

- Misstankarna om förekomst av *B. salicis* i Skåne har försvagats.
- Det är troligt att *B. salicis* inte förekommer i pilarna längs Sallerupsvägen i Eslöv.
- Om *B. salicis* förekommer där så är det i låga, endofytiska, koncentrationer.
- Om *B. salicis* förekommer i pilarna längs Natur- och kulturstigen i Burlöv så är det i låga, endofytiska, koncentrationer.
- Om *B. salicis* förekommer i pilarna i läplanteringen på Linders Plantskola i Köinge så är det i låga, endofytiska, koncentrationer.
- Universell 16s-PCR med ENV1 och ENV2 som primrar detekterar *B. salicis*.
- Metoden som beskrivs kan rekommenderas för uppföljning av *B. salicis* status.

Abstract

The bacterium *Brenneria salicis* resides in the xylem of *Salix* spp. and of some species of other genera. Under certain circumstances, it causes the wilt disease known as Watermark Disease.

No occurrence of this disease is known from Sweden. Recent research has shown the bacterium often to lead an endophytic lifestyle instead of a pathogenic one. This prompts the question whether the bacterium itself does occur but as an endophyte. That same research indicates that external factors can trigger the shift from endophyte to pathogen. Assuming climate and land use to be such factors and knowing them to be in change, investigating the spread of *B. salicis* becomes important. This thesis begins the search for scientific knowledge on the possible occurrence of *B. salicis* in Sweden.

Samples were taken from *Salix alba* 'Saba' on three locations in the county of Skåne. They were trialed for *B. salicis* through PCR-analysis. Presence of the bacterium could not be detected in any sample. Soil samples were also gathered at the sites for nutrient analysis.

This study, although limited in its scope, led to the following conclusions:

- Suspicions of *B. salicis* occurring in Skåne have weakened.
- It is probable that *B. salicis* does not occur in the willows along *Sallerupsvägen* in Eslöv.
- If *B. salicis* does occur there, it will be in low concentrations, as an endophyte.
- If *B. salicis* occurs in the willows along *Natur- och kulturstigen* in Burlöv, it will be in low concentrations, as an endophyte.
- If *B. salicis* occurs in the willows in the hedge at Linder's Nursery in Köinge, it will be in low concentrations, as an endophyte.
- The universal 16s-PCR with ENV1 and ENV2 as primers detects *B. salicis*.
- The method described herein can be recommended for a follow-up on the status of *B. salicis*.

Innehållsförteckning

1.Syfte och frågeställning	4
2. Bakgrund	4
3. Metod och Material	5
3.1. Platser	5
3.2. Provtagning	6
3.3. Bakterieextraktion	6
3.4. DNA-extraktion	6
3.5. PCR-analys	6
3.6. Odling och hantering av kontrollprov	7
3.7. PCR-optimering	7
4. Resultat	8
4.1. Näringsanalyser	8
4.2. PCR	8
4.3. Optimering	9
5. Diskussion	9
5.1. Näringsstatus	9
5.2. Konsekvenser	10
5.3. Framtida forskning	10
5.4. Val av metod	10
5.5. Felkällor	11
6. Slutsatser	12
7. Tack	12
8. Referenser	13

1. Syfte och frågeställning

Syftet med arbetet är att genomföra den första undersökningen av *Brenneria salicis* förekomst i Sverige. Bakteriens roll som patogen hos ett flertal taxa av *Salix* gör det ekonomiskt intressant att studera dess utbredning och populationsdynamik.

Frågorna är:

1- Förekommer *Brenneria salicis* i pilar i Skåne?

2- Finns det i så fall samband mellan koncentrationen av *Brenneria salicis* i pilarnas xylemvätska och markens näringsstatus?

2. Bakgrund

I många av världens *Salix*-bevuxna områden förekommer den sjukdom som på engelska heter Watermark Disease (WMD). I *Salix*-odlande områden är sjukdomen ibland ett allvarligt problem. Något etablerat svenskt namn på sjukdomen har inte gått att finna. Den nederländska termen, watermerkziekte, har bildats med det engelska uttrycket som förebild (Jansen, 1969). En motsvarighet på svenska hade varit vattenstämpelsjuka, men här tas inte ställning i frågan utan i detta arbete kommer WMD fortsättningsvis användas. Inga uppgifter som tyder på att sjukdomsutbrott förekommit i Sverige har gått att finna. Forsberg et al. (1991) samt Ramstedt (1992) ger stöd för uppfattningen att WMD inte förekommer.

WMD uppkommer då koncentrationen av *Brenneria salicis* i xylemvätskan överstiger $4 \cdot 10^7$ cfu ml⁻¹ (colony forming units). Genom kворumreglering (quorum sensing) får bakterierna då varandra att ställa om sin metabolism, utsöndra cellulas och övergå till en parasitär livsstil. Koncentrationen ökar vid hög sockerhalt i xylemets sav (Huvenne et al., 2009). Grenar kan dö (Jansen, 1969) eller hela träd (Maes et al., 2009).

Utbrott av WMD kan drabba åtminstone *S. alba* (De Vos et al., 2007), *S. bakko*, *S. sachaliensis* och *S. kinuyanagi* (Sakamoto et al., 1999), *S. amygdalina* och *S. purpurea* (Gremmen et De Kam, 1981), *S. fragilis* (Metcalf, 1940), *S. cinerea*, och *S. triandra* (Turner et al., 1992 via CABI, 2012) och troligtvis fler träd och buskar som kan bli aktuella för plantskoleodling och biomassaproduktion i framtiden.

Med "Watermark" åsyftas det våta område av splintveden som färgas mörkbrunt vid kontakt med luft (Sakamoto et al., 1999). Ett annat symptom är att blad antar en rödaktig färg och vissnar (Metcalf, 1940). De faller inte omedelbart av (Sakamoto et al., 1999). Troligtvis skiljer sig symptombilden något mellan arter.

Sakamoto et Sano (2000) kallar WMD en vissnesjuka och konstaterar att splintved med symptom innehåller mer vatten, men leder vatten sämre än frisk splintved. Detta beror på igsättning av bakterier (Sakamoto et Sano, 2000) och de stora mängder polysackarider som *B. salicis* utsöndrar och som sänker vävnadens vattenpotential (Sakamoto et Kato, 2002). Sistnämnda författare menar att något slags semipermeabelt membran som upprätthåller sockergradienten över veden sannolikt bildas. Enligt Sakamoto et Sano (2000) bidrar tyllbildning också till "vattenstämpeln". Bildandet av blöt kärnved (wet-heartwood), som t.ex. *S. sachalinensis* naturligt har, ger en mörkfärgning motsvarande den vid WMD (Sakamoto et Sano, 2000).

Brenneria salicis är i normala fall en endofytisk mutualistisk symbiont till bland annat pil (Maes et al., 2009). Bakterien har återfunnits i friska individers xylem hos *Salix spp*, *Populus spp*, *Crataegus sp*. (Hauben et al., 1998) och *Alnus glutinosa* i knappt mätbara koncentrationer (Maes et al., 2009). De driver med xylemströmmen, anrikas i skottspetsar och utsöndras vid guttation (Maes et al., 2009). I försök beskrivna av sistnämnda författare har *B. salicis* visats öka klorofyllhalt och tillväxt hos småplantor av *S. alba*. En gensekvens som kodar för nitrogenas-reduktas antyder en möjlig roll för *B. salicis* i växtens kväveförsörjning (Maes et al., 2009). Epifytism med okänd vidare livsstil har också observerats (Gremmen et De Kam, 1981).

WMD kan inte inträffa utan *B. salicis*, men eftersom *B. salicis* är så vanligt förekommande i friska träd (Maes et al., 2009) leder det tankarna fel att säga att *B. salicis* orsakar WMD. WMD orsakas av en ännu inte helt klarlagd kombination av abiotiska faktorer (De Vos et al., 2007), värdträdets xylemkemi (Huvenne et al., 2009) samt kolonisering av *B. salicis*.

De Vos et al. (2007) visade att studerade pilar med WMD växte på platser med signifikant högre ammoniumhalt i grundvattnet än studerade symptomfria pilar. Detta i flamländska jordbruksbygder där *B. salicis* anses finnas överallt. *Brenneria salicis* visades också förekomma i samtliga studerade träd. Huvenne et al. (2009) visar att det är koncentrationen av *B. salicis* i saven som avgör sjukdomsutbrott. Då dessa två studier vägs samman blir en rimlig tolkning att NH₄⁺ i marken påverkar dels NH₄⁺ i grundvatten och dels

koncentrationen av *B. salicis* i saven som i sin tur påverkar patogenes. En schematisk bild av sambandet ges i Bild 1. Bakterien har möjlighet att nå patogena koncentrationer i stillastående sav under vinterhalvåret hos de taxa som invintrar med savsammansättning som gynnar sådan tillväxt (Huvenne et al., 2009).

Bakteriekoncentrationen kan variera inom ett stort spann, men den använda PCR-analysen kan bara detektera eller inte detektera förekomst. Problemet går att komma runt om man antar att de studerade pilarna kommer ha bakteriekoncentrationer kring gränsen för vad som detekteras vid PCR. Då kommer fler träd på platser med näringsstatus som gynnar högre bakteriekoncentration hamna över gränsen och fler av övriga träd hamna under gränsen. Eftersom inga rapporterade sjukdomsutbrott från Sverige gått att finna är det också rimligt att anta att svenska pilars koncentration av *B. salicis* finns i den nedre delen av skalan. Därför förväntades en korrelation mellan detektion av *B. salicis* och hög ammoniumhalt.

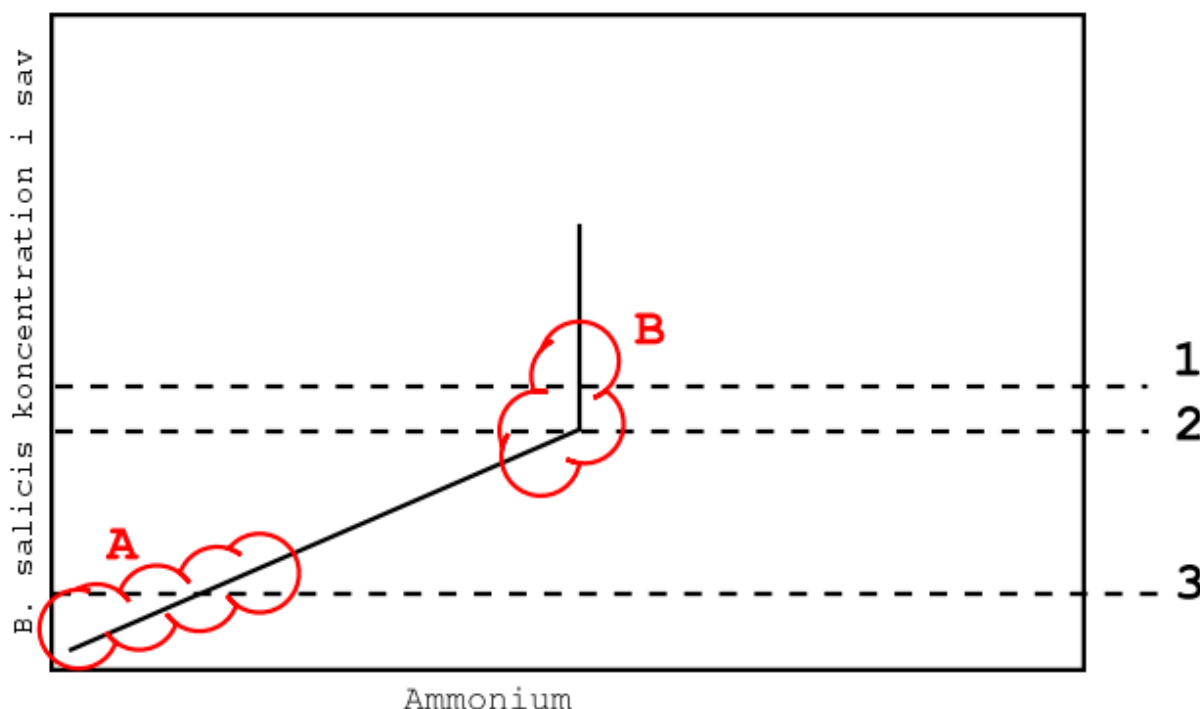


Bild 1. Princip för det samband som tros föreligga mellan mängden för växten tillgängligt NH_4^+ och koncentrationen av *B. salicis* i saven. 1: Gräns för WMD / synliga symptom (ca 10^{10} cfu ml^{-1} (Huvenne et al., 2009)), 2: Undre gräns för kvorumreglering (ca $4 \cdot 10^7$ cfu ml^{-1} (Huvenne et al., 2009)), 3: Gräns för vad som kan upptäckas med PCR (ca $2 \cdot 10^3$ cfu ml^{-1} (Huvenne et al., 2009)), A: Område som de i detta arbete studerade träden förväntades ligga i, B: Område som träden i De Vos et al. (2007) kan tänkas ha legat i.

3. Metod och Material

I detta projekt har grenprover tagits från pilar på tre platser i Skåne. De har testats för förekomst av *B. salicis* med PCR. Jordprover från platserna har också tagits för att om möjligt kunna konstatera eller antyda samband mellan denna förekomst och skillnader i platsernas näringsstatus. Jordanalyserna omfattade förutom vanliga näringsämnen också vissa andra ämnen samt pH och ledningstal.

3.1. Platser

En lista på ca 30 planteringar sammanställdes efter att bl.a. sju plantskolor, Trafikverket samt alla Skånes kommuner kontaktats. Från denna listan valdes tre ut eftersom de var med samma sort (*S. alba* 'Saba'), eftersom uppgifterna om sort var säkra och eftersom växtplatserna var tillfredsställande olika med avseende på markanvändning och geografiskt läge. Utöver dessa tre togs prover också i Höör trots avvikande och okänd sort.

Under sökandet efter platser informerades alla kontaktade om symptomen i grova drag, men bara från Höör hörde man av sig med besked om vissnande träd (Svensson, 2012). Detta stärkte bilden av att *B. salicis*, i fall den är förekommande i Skåne, är det i låga koncentrationer (jfr. Bild 1). Nedan följer en kort beskrivning av platserna. Deras koordinater enligt SWEREF 99 har bestämts med hjälp av <http://kartor.eniro.se>.

Burlöv (6166435, 379568): En plantering på 59 träd i rad mellan två stora åkrar längs Natur- och kulturstigen besöktes 29 november 2012 för grenprov och 6 december samma år för jordprov. Ett

sammanhängande avsnitt på 17 träd valdes ut, de två yttersta hoppades över och bland de andra 15 togs prover på fem jämnt spridda träd. Träden är uppstammade och knuthamlade. Planteringen utfördes 2004 (Aquarin, 2013).

Köinge (6189021, 419365): En läplantering till Linders Plantskola bestående av ett 30-tal individer besöktes 28 november 2012. Ett sammanhängande avsnitt på 15 träd valdes ut, de två yttersta hoppades över och bland de andra togs prover på fem jämnt spridda träd. Planteringen är från 2009 och pilarna skärs tillbaka nära marken vartannat år (Linder, 2013). Platsen för plantskolan var fram till för sex år sedan betesmark. Läplanteringen ligger i utkanten av denna och angränsande fastigheter betas fortfarande.

Eslöv (6188384, 392583): Prover togs 18 januari 2013. Mitt emot Sallerups Lågrpris valdes ett avsnitt på 15 träd ut ur den mycket långa trädraden längs Sallerupsvägen. Bland dessa togs prover på fem jämnt spridda träd. Träden är uppstammade kronträd, planterade år 2004 (Lickander, 2013). De står mellan den ganska livligt trafikerade vägen och en cykelbana som i sin tur gränsar till ett mindre grönområde.

Höör (6200366, 408589): Prover togs också från fem av de sex pilarna (*Salix* sp.) kring konstverket "Mittelen" vid Brännaremöllan 22 november 2012 efter uppgift (Svensson, 2012) om att de uppvisat vagt WMD-liknande symptom.

3.2. Provtagning

Tre grenbitar per träd togs som prov. De togs spritt i kronan. Grenarna var 0,75-2,5 cm Ø längs de 17 cm långa segment som togs. Eventuella blad och bladresten avlägsnades. Sekatören rengjordes med etanol mellan varje träd.

Jordprover togs med jordbör med 21 cm arbetsdjup. Tre prov per träd togs, spridda inom 2 m radie från trädet. Provtagen jord från samma plantering blandades i balja, varur ca 200-300 g skickades till LMI i Helsingborg för analys enligt modifierad Spurway.

Gren- och jordprov förvarades i kylrum mellan hanteringarna.

3.3. Bakterieextraktion

Sedan tre grenar insamlats från ett träd följdes metoden nedan, modifierad från Maes et al. (2009): Grensegmenten steriliserades utvändigt med etanol och eld. De skars i bitar på ca 0,5 cm. 300 ml bufferblandning förbereddes, bestående av 19,9 g Na₂HPO₄, 1,27 g KH₂PO₄, 1 g Na₄P₂O₇, 1 ml Tween20 (polysorbat 20) och 25 g polyvinylpyrrolidon per liter avjoniserat vatten. Lösningen sterilfiltrerades (0,2 µm). Grenbitarna lades i blandningen och det hela skakades vid rumstemperatur och 200-240 rpm i 90 min tillsammans med 20 g glaskulor med diametern 1 mm på skakbord (HS 501 digital från IKA®-WERKE). Blandningen filtrerades med VWR folded qualitative filter paper, 313 (5-8 µm). 200 ml av vätskan centrifugerades i ett antal steg så att en pellet till sist var samlad i ett 1,5 ml-rör. Centrifugering skedde tre gånger 30 min vid 5 000 x g och 4 °C och till sist 10 min vid 10 000 rpm.

3.4. DNA-extraktion

Pelleten användes av ScanBi Diagnostics i Alnarp för DNA-extraktion med CTAB och därefter kitet NucleoSpin 96 Plant II från Macherey-Nagel. Proverna inkuberades i CTAB (60-65°C), kloroform tillsattes, proven centrifugerades och sedan användes kitet från och med punkt 4 i manualen (*Genomic DNA from plant*, 2012) Den utfällda DNA-pelleten löstes upp i 100 µl vatten, 5 µl av detta användes till PCR.

3.5. PCR-analys

PCR utfördes enligt Maes et al. (2009):

Tre primrar användes: 5'-AACGTCAATCAACAACTTATTAAGTTTATCG3' (BrenS-R), 5'-GCGGCGGACGGGTGAGTAAA-3' (Es1A) och 5'-CTAGCCTGTCAGTTTTGAATGCT-3' (Es4B). Till de 5 µl enligt ovan tillsattes 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 2,5 µl 10x PCR buffer, 0,2 µl dNTP-mix (25 mM var), 0,5 µl av var och en av de tre primrarna (150 µg µl⁻¹), 1 U *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) och 13,1 µl vatten. Totalt 25 µl.

Analys i PCR-maskin (Applied Biosystems 7300). Program:

5 min vid 95°C

30 cykler med:

1 min vid 95°C,

1 min vid 66°C,

2 min vid 72°C
och sist 10 min vid 72°C. Proven genomgick elektrofores på färdigtillverkad agarosgel (Invitrogen E-gel 0,8 %). Också PCR-analys och elektrofores genomfördes av ScanBi Diagnostics.

3.6. Odling och hantering av kontroller

Kultur av *B. salicis* erhöles från Marine Maes (Plant Sciences Unit, ILVO, Burgemeester Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke, Belgien). Denna användes till positiva kontroller enligt nedan.

Till positiv kontroll för PCR användes kultur av *B. salicis* som fått tillväxa i 6 ml Tryptic Soy Broth (TSB) i två dygn vid 28 °C och sedan centrifugerats och pelleten resuspenderats i 6 ml 0,85 % NaCl-lösning. Lösningen kokades i ca 10 min för att lysera cellerna.

För att verifiera bakterie- och DNA-extraktionen användes kultur av *B. salicis* som fått tillväxa i 6 ml TSB i två dygn vid 28 °C och sedan centrifugerats och pelleten resuspenderats i 6 ml 0,85 % NaCl-lösning som TSB hållts ifrån. En ml av denna lösning användes i 300 ml fosfatbuffert med 20 g glaskulor och genomgick motsvarande behandling som för ett prov från ett träd.

Bakteriekoncentrationen i den tillsatta lösningen bestämdes genom att den späddes 1:10 sex gånger i serie och den sista utspädningen odlades på Tryptic Soy Agar i två dygn vid 28 °C varefter kolonierna räknades och antalet multiplicerades med 1 000 000 för att erhålla ursprungslösningens koncentration, $2 \cdot 10^9$ cfu ml⁻¹.

Vatten användes som negativ kontroll.

3.7. PCR-optimering

PCR:en med tre primers enligt Maes et al. (2009) provkördes av mig i december. Reaktionen hade modifierats av Crister Olsson (SLU) för att anpassas till det fabrikat av Taq-polymeras som användes (Thermo Scientific). Till 1 µl DNAprov tillsattes 2,0 µl 10X Taq Buffer med Kcl, 2,0 µl 25 mM MgCl₂, 0,4 µl dNTP-mix (10 mM var), 0,9 µl av varje primer, 0,1 µl Taq DNA Polymerase och 11,8 µl autoklaverat filtrerat (0,2µm) vatten. Totalt 20 µl. Värmebehandling i PCR-maskin (VWR UnoCycler):

2 min vid 95 °C,

30 cykler med:

1 min vid 95 °C,

1 min vid 66 °C,

2 Min vid 72 °C

och sist 10 min vid 72 °C. Positiv kontroll enligt ovan utgjorde prov i koncentrerad form respektive utspädd 1:10.

Jag provkörde också *B. salicis*-specifik PCR med två primers (Es1A och Es4B) efter Hauben et al. (1998) för att se vilken metod som skulle fungera bäst under våra förutsättningar. PCR:en med tre primers ovan, enligt Maes et al. (2009), är en vidareutveckling av denna. Också denna reaktion hade modifierats för att passa Thermo Scientifics rekommendationer som ovan. Till 1 µl prov tillsattes 2,0 µl 10X Taq Buffer med Kcl, 1,2 µl 25 mM MgCl₂, 0,4 µl dNTP-mix (10 mM var), 0,9 µl av varje primer, 0,1 µl Taq DNA Polymerase och 13,5 µl autoklaverat filtrerat (0,2µm) vatten. Totalt 20 µl. Värmebehandling i PCR-maskin (VWR UnoCycler):

2 min vid 95 °C,

35 cykler med:

25 sek vid 95 °C,

25 sek vid 68 °C,

40 sek vid 72 °C

och sist 10 min vid 72 °C. Positiv kontroll enligt ovan utgjorde prov i koncentrerad form respektive utspädd 1:10, 1:100 och 1:1000.

Proverna från Höör analyserades med universella 16s-primrar. De var 5'-

AGAGTTTGTATXCTGGCTCCAG-3' (ENV1) och 5'-CGGXTACCTTGTTACGACTT-3' (ENV2).

Till 1 µl prov tillsattes 2,0 µl 10X Taq Buffer med Kcl, 1,2 µl 25 mM MgCl₂, 0,4 µl dNTP-mix (10 mM var), 0,4 µl av varje primer, 0,1 µl Taq DNA Polymerase och 14,5 µl autoklaverat filtrerat (0,2µm) vatten. Totalt 20 µl. Värmebehandling i PCR-maskin (VWR UnoCycler):

5 min vid 95 °C,

30 cykler med:

15 sek vid 95 °C,

30 sek vid 50 °C,

90 sek vid 72 °C

och sist 7 min vid 72 °C.

Produkterna från dessa tre PCR:er genomgick elektrofores på 1,5% agarosgel.

4. Resultat

4.1. Näringsanalyser

Provsvaren från jordanalyserna redovisas i vänster halva av tabell 1. Höör och Köinge hade låga kvävehalter, Eslöv hade högst. Det omvända gällde för kalcium. I höger halva av tabellen finns motsvarande siffror från De Vos et al. (2007) för jämförelse. För just dessa siffror kunde De Vos et al. (2007) inte finna något signifikant samband med WMD. Proven i denna studie hade genomgående högre ledningstal och järnhalt än värdena från De Vos et al. (2007).

Tabell 1. Resultat från näringsanalyser av yttjord. Till vänster provsvaren från vår studie, till höger jämförbara siffror från De Vos et al. (2007). A1 och A2 är platser med symptom på WMD, U1 och U2 är platser utan symptom, men med *B. salicis* (De Vos et al., 2007).

	Höör	Köinge	Burlöv	Eslöv	U1	U2	A1	A2	
pH	7,4	7,4	6,3	6,1	6,6	6,2	6,6	5,9	pH _{H2O}
ledningstal EC mS cm ⁻¹	0,5	0,6	0,5	0,5	0,2	0,07	0,1	0,1	EC mS cm ⁻¹
Nitratkväve mg/l	0	2	4	14					
Ammoniumkväve mg/l	3	1	4	9	12	3	14	6	vattenlösl. N mg/l
Fosfor mg/l	1	15	21	17	40	4	11	12	vattenlösl. P mg/l
Kalium mg/l	47	56	41	145	200	34	270	394	vattenlösl. K mg/l
Magnesium mg/l	31	35	37	48	116	49	125	82	vattenlösl. Mg mg/l
Svavel mg/l	2	3	8	16	36	<10	26	<10	vattenlösl. SO ₄ mg/l
Kalcium mg/l	1645	1904	545	434	2117	601	1368	695	vattenlösl. Ca mg/l
Mangan mg/l	1,6	0,9	1,9	1,4	6,9	1,6	2,5	1,8	vattenlösl. Mn mg/l
Järn mg/l	174	227	193	230	34	40	31	21	vattenlösl. Fe mg/l
Natrium mg/l	15	13	37	154					
Klorid mg/l	6	7	15	52					
Koppar mg/l	2,7	2,6	4,8	4,2					
Bor mg/l	0,6	0,7	1,5	0,5					
Zink mg/l	3	7	3	10					
Molybden mg/l	0,18	0,2	0,14	0,13					
Aluminium mg/l	1,8	1,2	3,8	23					

4.2. PCR

Brenneria salicis detekterades inte i något av de 15 proven, se bild 2. Proverna från Höör blev av praktiska orsaker inte analyserade med *B. salicis*-specifik PCR.

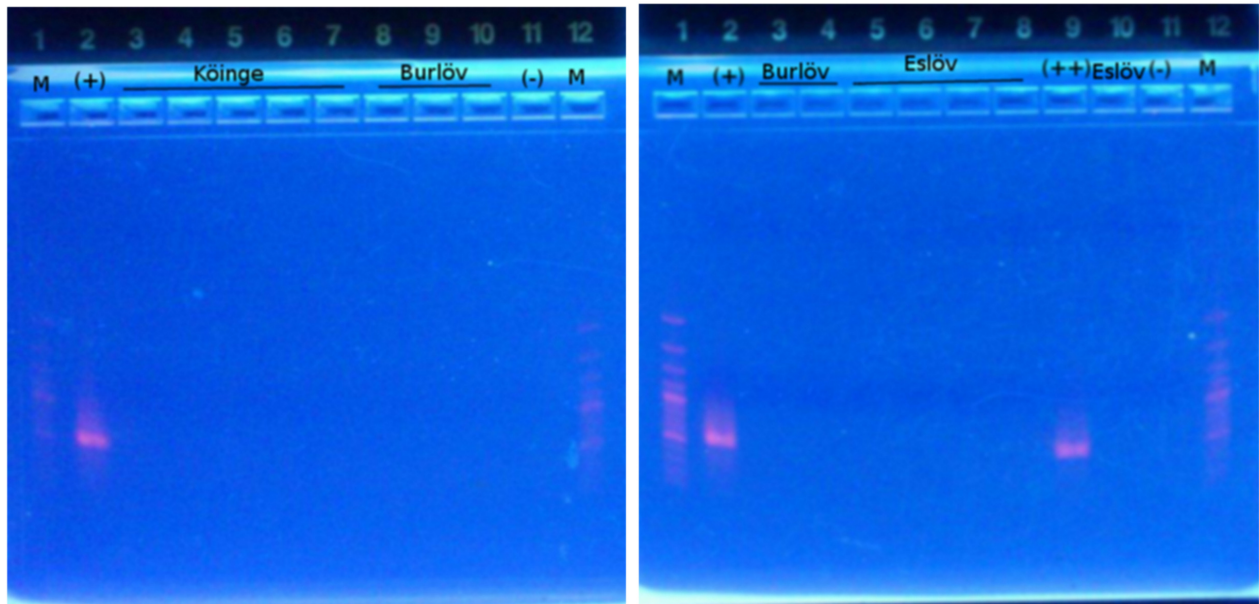


Bild 2. Agarosgel med PCR-produkter. Banden vid positiva kontroller är vid ca 500 bp, som förväntat. (M)=markör (DNA Ladder), (+)=positiv kontroll för PCR, (++)=positiv kontroll för extraktion Foto: ScanBi Diagnostics, min etikettering.

4.3. Optimering

Brenneria salicis detekteras vid universell 16s-PCR med primrarna ENV1 och ENV2. *Brenneria salicis*-specifik PCR med två primrar enligt Hauben et al. (1998) med de modifikationer som beskrivits detekterar *B. salicis*. Samma sak gäller för *B. salicis*-specifik PCR med tre primrar enligt Maes et al. (2009) med modifikationer som ovan. Specifik PCR med tre primrar gav tydligare band än specifik PCR med två primrar när utspädd kontroll (1:10) användes.

5. Diskussion

5.1. Näringsstatus

Eslövsprovet hade högre natriumhalt än de andra proverna. Det kan antas bero på närheten till Sallerupsvägen och den halkbekämpning som troligen utförs där. Natrium hämmar upptaget av kalcium (Rengel, 1992 via Hawighorst, 2007) och stör cellväggens inlagring av kalcium (Cramer, 2002). De Vos et al. (2007) kunde visa att bladens kväve-kalcium-kvot hos träd koloniserade av *B. salicis* signifikant skiljer sig mellan träd med och utan symptom på WMD. Samma författare nämner NH_4^+ som en annan hämmare av kalciumupptag. Det ligger därför nära till hands att spekulera att platsens höga natrium- och kvävehalt, med mycket ammonium, i kombination med mycket låg halt kalcium borde innebära ökad risk för utbrott av WMD om *B. salicis* vore närvarande. Resonemanget talar för att *B. salicis* inte förekommer i koncentrationer under detektionsgränsen för PCR på platsen utan är helt frånvarande. Det finns dock flera skäl att vara försiktig med att dra för tvärsäkra slutsatser. Den aktuella sortens mottaglighet är inte känd. Eventuellt har platsens klimat en reglerande inverkan på bakteriens vinterpopulation (Huvenne et al., 2009). Vidare bygger resonemanget på mätdata från ett enda tillfälle. Upprepade mätningar eller hellre bladanalyser hade varit nödvändiga för att bilda sig en uppfattning om mängden för växten tillgänglig näring över tid. Marken var dessutom tjälad vid provtagningen, vilket kan tänkas snedvridera resultaten eftersom ovanifrån deponerade ämnen torde ackumuleras i högre grad då.

Provet från Eslöv visar också betydligt högre aluminiumhalt än andra platser, men i en kommentar till analysvaret menar man från LMI att det troligtvis beror på fint ler som passerat filtret. Den använda analysmetoden registrerar också aluminium i eventuella suspenderade partiklar och man håller det för otroligt att löst aluminium förekommer vid det pH som uppmätts.

Provtagningsplatsen i Höör uppvisar låga värden för kväve och relativt höga värden för kalcium vid provtagningsstillfället. Detta är i bästa fall svaga indicier, men om det kan visas gälla för året som helhet antyder det att misstankarna inte i första hand bör falla på WMD när trädens symptom ska förklaras.

När analysvaren jämförs med de siffror som finns från De Vos et al. (2007) framträder inga slående skillnader. Det tål dock att påpekas att det kan föreligga stora eller små skillnader i exakt vad som mätts och hur. De siffror från De Vos et al. (2007) som närmast verkar motsvara våra värden har tillfogats tabell 1.

Eftersom inga skillnader i förekomst av *B. salicis* kunde visas har resultaten av näringsanalyserna och deras inbördes förhållanden inte behandlats statistiskt.

5.2. Konsekvenser

De direkta konsekvenserna av denna studie för plantskolebranschen är begränsade. Innan fanns det inga bevis för förekomst av *B. salicis* i Sverige och det finns inte nu heller. Då som nu finns det skäl att hålla ett öga på utvecklingen. Erfarenheten från Nederländerna är att WMD snabbt kan utvecklas från sporadiska utbrott till landsomfattande problem (Jansen, 1969). Man kan tänka sig två scenarion då WMD utgör ett hot mot fortsatt användning av vissa taxa av *Salix*. Det första är om bakterien är spridd i landet men någon faktor håller nere koncentrationerna. Det finns indicier på att sträng vinterkyla kan decimera populationen (Huvenne et al., 2009). Det finns goda skäl att vänta sig att att Skånes klimat inom 100 år kommer likna dagens centraleuropeiska (Skov et al., 2009) och därmed också att vinterns reglerande effekt på eventuella populationer av *B. salicis* kommer avta. I detta fall är det alltså symptom som sprids, snarare än en smitta, och den enda effektiva åtgärden blir att välja resistent material. Det andra scenariot är om *B. salicis* inte är spridd men varken klimat eller någon annan faktor är begränsande. I så fall krävs bara att bakterien kommer i kontakt med känsligt växtmaterial för att spridningen ska kunna börja. I det scenariot blir fytosanitet i odling och handel med plantor en viktig åtgärd.

Konsekvenserna för energiskogsnäringen blir ännu mindre. Liksom de flesta tidigare studier har denna studie gjorts på *Salix*-sorter för prydnad. Unga skott får sällan symptom (Jansen, 1969; De Kam, 1983). Trädformiga pilar som utsätts för hamling klarar sig generellt sett bättre (Gremmen et De Kam, 1981, Maes et al., 2009). Så även om en energiskogssort skulle råka vara känslig och *B. salicis* skulle finnas, är riskerna för skador små eftersom de skott som skördas sällan är äldre än tre-fyra år (Hollsten et al., 2012).

Om omfattande gren- och tr addedöd skulle drabba *S. alba* och den besläktade *S. x rubens* i Skåne skulle det få etnologiska konsekvenser för framförallt sydvästra Skåne, som redan mist en stor del av sina tidigare så dominerande pilevallar (Olsson, 2012).

5.3. Framtida forskning

Efter att den första studien om *B. salicis* förekomst i Sverige genomförts kvarstår ett stort behov av vidare studier. Mer omfattande screening av samma typ som den här beskrivna behövs om man vill kunna uttala sig om bakteriens regionala förekomst med något mått av säkerhet.

Vädrets inverkan på bakteriernas överlevnad i växten, som diskuteras i Huvenne et al. (2009), är inte kartlagd. Kunskap om detta kan vara avgörande för att finna gränsen för *B. salicis* utbredningsområde respektive gränsen för det område där de koncentrationer som ger WMD kan uppkomma.

Växtplatsens näringsstatus inverkan på *B. salicis* koncentration i växten behöver utredas närmre. De växtfysiologiska mekanismerna för denna inverkan likaså.

Under utprovningen av nya sorter bör sårbarhet för WMD undersökas. Med nuvarande kunskapsläge kan den metod rekommenderas som beskrivs i Huvenne et al. (2009) där man *in vitro* ympar steriliserad sav med *B. salicis* och studerar tillväxten. Saven bör samlas på hösten. På så vis kontrollerar man trädets teoretiska möjlighet att försörja en skadligt hög vinterpopulation utan att behöva vänta i många år på att symptom ska visa sig. Försök med inokulering av träd med *B. salicis* brukar misslyckas eller ge otydliga resultat (Gremmen et De Kam, 1981) utom i Japan (Sakamoto et al., 1999).

5.4. Val av metod

I Hauben et al. (1998) och i De Vos et al. (2007) pressades proverna (grenbitar) i skruvstäd och vätskan fångades upp i e-kolv eller provrör inför PCR. I Huvenne et al. (2009) och i Maes et al. (2009) gjorde man på samma sätt för att få fram vätska för odling på agar, men för PCR lade man bitar på 0,5 cm i en buffertblandning, som efter 90 minuters omröring gick vidare till DNA-extrahering. De Vos et al. (2007) tillsätter de urkrämade grenarna skurna i bitar till buffertblandningen och är således en variant på den metoden. Skillnaderna verkade inte alltför stora. Här har metoden från 2009 (den utan skruvstäd) använts eftersom den är nyast och man kan anta att det ligger något praktiskt övervägande bakom att man ändrat sig (artiklarna har i princip samma författare).

De Vos et al (2007) fann samband mellan utveckling av WMD-symptom och kvävehalten i grundvattnet, tydligast för NH_4^+ . Samband mellan markens kvävehalt och symptomutveckling kunde de inte fastslå. För kväve i blad fanns ett samband, men det var inte signifikant. Grundvattenståndet på de studerade platserna var överlag högt (De Vos et al., 2007). Jag har i detta arbete tagit markprover och inte grundvattenprover. Dels för att själva provtagningen blir mycket enklare, dels för att kvävet i grundvatten kommer från markvattnet. De Vos et al (2007) jämför dels Kjeldahl-kväve och dels vattenlösligt kväve. Kjeldahl-kväve är delvis inte växttillgängligt, platser med hög mullhalt får högre värde än andra. Vad gäller vattenlösligt kväve

så varierar mängden över året och det framgår inte i De Vos (2007) när man tagit proverna. Vintern är högsäsong för kväveläckage (White et al., 1983; Brundin et al., 1990; Wennberg et Gustafsson, 1992; Nilsson, 1994; Faure, 1998; St. Luce et al., 2011) och skillnader mellan platser i mineraliserat kväve i marken vid denna årstid borde spegla skillnader i kväve i grundvattnet under resten av året relativt väl. Samma resonemang kan väntas gälla för andra lakkänsliga näringsämnen.

Syftet med universell 16s-PCR var att bekräfta om DNA-extraktionen lyckats. Metoden anses detektera de flesta bakterier och har tidigare bl.a. använts till studier av *Escherichia* spp., *Erwinia* spp., *Enterobacter* spp., *Moellerella* spp., *Serratia* spp., *Rahnella* spp. (Olsson et al., 2004) och *Lactobacillus* spp., (Axling et al., 2012). Om ett prov som gett utslag vid universell PCR inte gett det vid specifik PCR hade det måst bero på att *B. salicis* inte fanns [i tillräcklig mängd] i provet. Om provet däremot inte gett utslag vid universell PCR så hade uteblivet utslag vid specifik PCR berott på misslyckad DNA-extraktion. Detta syfte uppnåddes med godtagbar tillförlitlighet genom att låta odlade bakterier genomgå extraktion och PCR som beskrivits ovan. På grund av detta och att problem med att få universell 16s-PCR att fungera tillfredsställande övergavs den som verifikationsmetod.

5.5. Felkällor

Alla sätt som vår hantering av proverna systematiskt skiljt sig från den i Maes et al. (2009), det verk vars arbetsgång vi haft som mål att följa, måste analyseras som möjliga felkällor. Nedan följer en genomgång av dem. Det bedöms som osannolikt att någon av dem inverkat menligt på studien.

Det framgår inte av Maes et al. (2009) om och hur fosfatbufferten steriliserats. Utan denna information ville jag ogärna autoklavera bufferten eftersom det fanns uppgifter som talade emot (*TWEEN® 20 (P5927)* - *Product Information Sheet*, u.å.). När proverna från Höör förbereddes hade tillväxt observerats i en flaska osteriliserad buffert som stått i kylrum mellan extraktionsomgångarna. Därför behövde buffertarna steriliseras och då återstod filtrering. Om någon komponent blivit otillräckligt löst under omröringen kan den filtrerats bort med följd att buffertens sammansättning ändrats. Buffertflaskorna fick stå på omröring en stund efter att inga partiklar längre kunde ses med blotta ögat. Därför bedöms risken för att ha filtrerat bort något salt som mycket liten.

Maes et al. (2009) skakade sina prov vid 100 rpm i 90 minuter vid 25°C. Vi hade ingen möjlighet att reglera temperaturen i det rum skakbordet stod i. Rumstemperaturen kan bedömas ha varit 20°C. Vid 100 rpm gjordes bedömningen att proven skakade för lite. Inställningen ändrades till en där vätskan skakades om ordentligt och glaskulorna rörde på sig. Den exakta inställningen varierade mellan 200 och 240 rpm. Rimligtvis påverkar fler faktorer än varvtalet hur omskakad bufferten blir. Kärlets storlek och form ger olika vågor. Utformandet av den excenter eller kammekanism som omvandlar motorns rotation till fram-och-tillbaka-rörelse ger olika ryckighet i vändningarna och skak med större eller mindre regelbundenhet. Därför är RPM en för grov indikator på omskakningsgrad för att ensam avgöra graden av extraktion ur xylem till buffert.

Av beskrivningen i Maes et al. (2009) att döma kunde de samla en pellet genom en centrifugering på 30 min vid 4250 g och 4°C. Med de resurser som stod mig till buds kunde pelleten först samlas efter en serie centrifugeringar. För att kompensera för eventuella förluster längs vägen har proven centrifugerats vid högre hastighet, men varje gång 30 min och vid 4°C.

DNA-extraktion skedde i Maes et al. (2009) med extraktionskitet "Puregene Kit" från Gentra följt av extraktion med isoamylalkohol och fenol i lika mängd och en extra etanolprecipitation. På ScanBi Diagnostics användes en annan metod som enligt deras erfarenhet ger *bättre* resultat än med fenol-extraktion (Sandager, 2013).

Ovanstående fyra skillnader är möjliga felkällor om de, var och en för sig eller i kombination, kan ha sänkt extraktionens effektivitet. Maes et al. (2009) uppmätte en detektionsgräns på $2 \cdot 10^3$ cfu ml⁻¹ för prover från sav och Line Sandager (2013) på ScanBi Diagnostics bedömer att gränsen kan förväntas vara ungefär samma med de förändringar som gjorts i DNA-extraktionsmetod. Extraktionskontrollen innehöll $2 \cdot 10^9$ cfu ml⁻¹, alltså finns det teoretiskt utrymme för att bakterieextraktionens utbyte minskar med en faktor på 10^6 innan kontrollen inte längre detekteras. För att kunna bevisa extraktionens effektivitet bör man i framtida studier använda flera extraktionskontroller med stegvist sjunkande koncentration, gärna injicerade i grensegment. Alla förändringar verkar dock marginella och harmlösa. Det är svårt att se att någon av dem skulle försämrat extraktionen.

Prov till denna studie togs på pilar av sorten *S. alba* 'Saba'. Denna sorts mottaglighet och känslighet för *B. salicis* är så vitt jag kan bedöma inte studerad. Om vi oavsiktligt undersökt en helt eller delvis resistent sort påverkas givetvis resultatens giltighet. Detta får ändå anses som osannolikt. Erfarenheten från Belgien är att sorter av *S. alba* är känsligare än de av *S. fragilis* (Steenackers et Van Peteghem, u.å.).

6. Slutsatser

- **Universell 16s-PCR med ENV1 och ENV2 detekterar *B. salicis*.**
- **Det är troligt att *B. salicis* inte förekommer i pilarna längs Sallerupsvägen i Eslöv.**
- **Om *B. salicis* förekommer där så är det i låga, endofytiska, koncentrationer.**
- **Om *B. salicis* förekommer i pilarna längs Natur- och kulturstigen i Burlöv så är det i låga, endofytiska, koncentrationer.**
- **Om *B. salicis* förekommer i pilarna i läplanteringen på Linders Plantskola så är det i låga, endofytiska, koncentrationer.**
- **Misstankarna om förekomst av *B. salicis* i Skåne har försvagats.**
- **Den beskrivna metoden kan rekommenderas för uppföljning av *B. salicis* status.**

7. Tack

Stort tack till:

Sammar Khalil, Christer Olsson, Johanna Witzell, Martine Maes, Peter Linder, Eva Aquarin, Allan Lickander, Anna Svensson, ScanBi Diagnostics, Tora Pålsson, LMI AB, Hans Åström, Salixprodukter i Heberg, Erik Persson, Erling Seger, Johan Svensson, Reine Malmgren, Herman Cassé, Patrick Svensson, Peter Sandberg, Lennart Björck, Jenny Hertsgård, Henrik Arvidsson, Richard Åkesson, Rolf Sjöstrand, Christian Bucher, Nils Andersen, Manfred Dröschner, Camilla Persson, Lennart Persson, Ulf Andersson, Alex Bentervall, Anna Palm, Pontus Eriksson, Johan Högström och Partnerskap Alnarp.

Projektet har finansierats med medel från Partnerskap Alnarp.

8. Referenser

Aquarin, E., (2013), Burlövs Kommun, mailkorrespondens, 2013-02-26

Axling, U., Olsson, C., Xu, J., Fernandez, C., Larsson, S., Ström, K., Ahrné, S., Holm, C., Molin, G., Berger, K., (2012), *Green tea powder and Lactobacillus plantarum affect gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice*, Nutrition & Metabolism, 9:105.

Brundin S., Johnsson B., Sterner F., Silvander U., Drake L., (1990), *Kväveläckage*, tillgänglig: http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/rapport_ekonomi/REK028/REK028E.HTM, [2013-03-17]

CABI, 2012, *Invasive Species Compendium - Brenneria salicis (watermark)*, tillgänglig: <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=21936&loadmodule=datasheet&page=481&site=144#>, [2013-03-17]

Cramer, G.R., (2002), *Sodium-calcium interactions under salinity stress*, I: Läuchli, A., Lüttge, U. (Red:er), Salinity. Environment-plants-molecules, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 205-227

De Kam, M., (1983), *The Watermark disease is not transmitted with one-year-old cuttings of Salix alba*, European Journal of Forest Pathology, 13, 212–215

De Vos, B., Huvenne, H., Messens, E., Maes, M., (2007), *Nutritional imbalance caused by nitrogen excess is correlated with the occurrence of watermark disease in white willow*, Plant Soil, 301, 215–232

Faure, P., (1998), *Kväveläckage i ekologisk odling*, tillgänglig: http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/semin_vaxtodlingslara/SEV935/SEV935.HTM, [2013-03-17]

Forsberg J., Johansson H., Ramstedt M., Åhman I., (1991), *Skadegörare i energiskog av Salix*, tillgänglig: http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/spec_skrifter/SPS47/SPS47.HTM, [2013-03-13]

Genomic DNA from plant, (2012), User Manual NucleoSpin 96 Plant II February 2012/Rev. 02, Macherey-Nagel

Gremmen, J., De Kam, M., (1981), *New developments in research into the Watermark disease of White willow (Salix alba) in the Netherlands*, European Journal of Forest Pathology, 11, 334-339

Hauben, L., Steenackers, M., Swings, J., (1998), *PCR-Based Detection of the Causal Agent of Watermark Disease in Willows (Salix spp.)*, Applied and Environmental Microbiology, 64, 3966–3971

Hawighorst, P., (2007), *Sodium and calcium uptake, transport and allocation in Populus euphratica and Populus x canescens in response to salinity*, Dissertation In Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree (Dr. forest.), Georg-August-Universität Göttingen

Hollsten, R., Arkelöv, O., Ingelman, G., (2012), *Handbok för salixodlare*, Jordbruksverket, OVR250, [Broschyr]

Huvenne, H., Messens, E., Maes, M., (2009), *Willow wood sap promotes the density-dependent pathogenesis of Brenneria salicis*, Environmental Microbiology, 11(6), 1463–1472

Jansen, E.C., (1969) *De watermerkziekte, een ernstige bedreiging van de schietwilg (Salix alba L.)*, Nederlands bosbouwtijschrift, 41, 118-126

Lickander, A., (2013), Eslövs Kommun, mailkorrespondens, 2013-03-01

Linder, P., (2013), Linders Plantskola, mailkorrespondens, 2013-02-26

- Maes, M., Hanneke, H., Messens, E., (2009), *Brenneria salicis, the bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood*, Environmental Microbiology, 11(6), 1453–1462
- Metcalf, G., (1940), *The watermark disease of willows: I. host-parasite relationships*, The New Phytologist, 39(3), 322-332
- Nilsson, H., (1994), *Grön mark - ett sätt att minska kväveläcket, tillgänglig: <http://www.vaxteko.nu/html/sll/sjv/jordbruksinfo/JIN94-01/JIN94-01.HTM>*, [2013-03-17]
- Olsson, C., Ahrné, S., Pettersson, B., Molin, G., (2004), *DNA Based Classification of Food Associated Enterobacteriaceae Previously Identified by Biolog GN Microplates*, Systematic and Applied Microbiology, 27, 219–228
- Olsson, P., (2012), *Ömse sidor om vägen - Allén och landskapet i Skåne 1700 – 1900*, Skogs- och lantbrukshistoriska meddelanden nr 59
- Ramstedt, M., (1992), *Svamp och bakteriesjukdomar på Salix i energiskogsodling, tillgänglig: http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/svenska_vaxtsk_konf/SVS1992/SVS1992N.HTM*, [2013-03-13]
- Rengel Z., (1992), *The role of calcium in salt toxicity*, Plant Cell and Environment 15, 625-632.
- Sakamoto, Y., Kato, A., (2002), *Some properties of the bacterial wetwood (watermark) in Salix sachalinensis caused by Erwinia salicis*, IAWA Journal, Vol. 23 (2), 179–190
- Sakamoto, Y., Sano, Y., (2000), *Inhibition of water conductivity caused by watermark disease in Salix sachalinensis*, IAWA Journal, 21 (1), 49–60
- Sakamoto, Y., Takikawa, Y., Sasaki, K., (1999), *Occurrence of watermark disease of willows in Japan*, Plant Pathology, 48, 613–619
- Sandager, L., ScanBi Diagnostics, (2013), mailkorrespondens, 2013-03-13
- Skov, F., Nygaard, B., Wind, P., Borchsenius, F., Normand, S., Balslev, H., Fløjgaard, C., Svenning, J., (2009), *Impacts of 21st century climate changes on flora and vegetation in Denmark*, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 8
- St. Luce, M., Whalen, J.K., Ziadi, N., Zebarth, B.J., (2011), *Nitrogen Dynamics and Indices to Predict Soil Nitrogen Supply in Humid Temperate Soils*, Advances in Agronomy, 112, 55-102
- Steenackers, M., Van Peteghem, P., (u.å.), *Willow resistance to the watermark disease, tillgänglig: http://inbo.be/content/page.asp?pid=EN_SUS_FOR_FRM_IMP_willows_path*, [2013-03-12]
- Svensson, A., (2012), Höörs Kommun, mailkorrespondens, 2012-11-13
- Turner J., Davis J., Güven K, 1992. *Watermark disease of tree willows*, Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 98B, 105-117
- TWEEN® 20 (P5927) - Product Information Sheet, (u.å.), Sigma-Aldrich Inc., tillgänglig: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p5927pis.Par.0001.File.tmp/p5927pis.pdf, [2013-03-13]
- Wennberg K., Gustafson A., (1992), *Våtmark som kvävefälla i åkerlandskapet, tillgänglig: http://www.vaxteko.nu/html/sll/slu/slu_info_rapp_allm/IRA177/IRA177M.HTM*, [2013-03-17]
- White, R.E., Wellings, S.R., Bell, J.P., (1983), *Seasonal variations in nitrate leaching in structured clay soils under mixed land use*, Agricultural Water Management, 7, 391-410